

特開平7-59597

(43) 公開日 平成7年(1995)3月7日

(51) Int.Cl.⁵

C 1 2 Q 1/34

識別記号

庁内整理番号

6807-4B

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 1 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平5-207824

(22) 出願日 平成5年(1993)8月23日

(71) 出願人 000131474

株式会社シノテスト

東京都千代田区神田神保町一丁目56番地

(72) 発明者 三輪 匡男

静岡県静岡市池田1087-10

(72) 発明者 鈴木 康夫

静岡県静岡市瀬名200-16

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔 (外2名)

(54) 【発明の名称】 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定方法

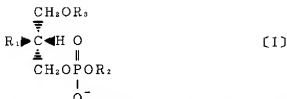
(57) 【要約】

【目的】 非放射性基質を用いる操作が安全、迅速、簡便、かつ高精度な血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼの直接測定法を提供する。

【構成】 PAF類縁体化合物を基質とし、これに試料中の血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを作用させ、生成されるジカルボン酸を測ることにより、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性の測定を行う方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性の測定において、基質として一般式〔I〕



(式中、R₁ は炭素数が4から9の脂肪族ジカルボン酸基を示し、R₂ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を示し、R₃ はアシル基又はアルキル基を示す)で表されるPAF類似体化合物を用いることを特徴とする血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、臨床上に重要な血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性を測定する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】血小板活性化因子(PAF)〔1-アルキル-2-アセチル-s-n-グリセロ-3-ホスホリン〕は、炎症やアレルギー反応等広範囲の各種病態発症に関与するメディエーターである。また、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ(PAFアセチルヒドロラーゼ)は、PAFの持つ強力な生物活性を消去する機能を有しており、生体内のPAFレベルを調節し、生体の恒常性維持に関与している。そして、川崎病、全身性エリトマトデス及び溶血性尿毒症候群等の疾患時に、病態の進行に伴い、健康時には認められない血清中のPAFアセチルヒドロラーゼ活性の変動が観察されている。

【0003】このように、血清または血漿中のPAFアセチルヒドロラーゼ活性は各種炎症性患者の発症、病態変化を反映しているため、PAFアセチルヒドロラーゼ活性の測定は、これらの疾患の診断に有用な情報をもたらす新規な臨床検査法として重要なものである。また血清PAFアセチルヒドロラーゼ欠損者が存在し、この酵素欠損が重篤な小児喘息のリスクファクターと見なされており、PAFアセチルヒドロラーゼ活性の測定は予防医学の面からも有用性が示されている。

【0004】更に、本発明者らの研究によると、PAFアセチルヒドロラーゼには血清型と組織細胞型が存在するが、炎症疾患時に細胞外に漏出してきてと考えられる組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼは特にこれらの疾患との関連が起るため、組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼ活性の測定は疾患の診断に重要であると推察される。

【0005】従来PAFアセチルヒドロラーゼ活性は、

放射性同位元素である³Hあるいは¹⁴Cでアセチル基又はアルキル基を標識したPAFを用いたり、あるいは残存する未反応基質であるPAFをバイオアッセイで定量し、測定していた。しかしながら、放射性同位元素標識PAFを用いる従来のPAFアセチルヒドロラーゼ活性測定法では、使用者および使用施設が限定され、また安全性あるいは放射性試薬の廃棄等の問題があり、一方標識を行っていないPAFを基質として反応生成物のリゾPAFあるいは未分解のPAFを測定するには有機溶媒による抽出や、混在する脂質を除去するためのクロマトグラフィーによる精製操作等煩雑な操作が必要であり、さらに未反応のPAFをバイオアッセイあるいはRIAで測定するには、それぞれ血小板の使用時調製あるいは高価な試薬が必要となるなど、一般の検査法として利用するには困難な問題が存在した。

【0006】また、本発明者らはチオPAF及びチオPAF類似体化合物を基質とするPAFアセチルヒドロラーゼ活性測定方法を発明し、先に出願を行ったが(特願平3-120286号)、この測定方法においてSH基検出試薬としてDTNBを用いる場合には、組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼはDTNBにより阻害を受けてしまう。

【0007】

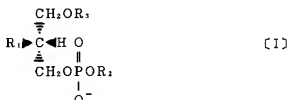
【発明が解決しようとする課題】上記のような現状に鑑みて本発明者らは、PAFアセチルヒドロラーゼ活性の測定方法として、組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼが阻害を受けることのない測定方法であって、非放射性基質を用いる安全でかつ操作が簡便な直接測定方法の開発を課題とし、鋭意研究を行い本発明を完成するに至った。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性の測定において、基質として一般式〔I〕

【0009】

〔化2〕



【0010】(式中、R₁ は炭素数が4から9の脂肪族ジカルボン酸基を示し、R₂ はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を示し、R₃ はアシル基又はアルキル基を示す)で表されるPAF類似体化合物を用いることを特徴とする血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ活性測定方法にある。

【0011】本発明における一般式〔I〕のR₁は炭素

数が4から9の脂肪族ジカルボン酸基を示し、この脂肪族ジカルボン酸基は飽和または不飽和のいずれでもよく、例えば、スクシニル基、グルタリル基、アジポイル基又はスベロイル基等が挙げられる。 R_2 はモノメチルアミノエチル基、ジメチルアミノエチル基又はトリメチルアミノエチル基を示す。

【0012】 R_3 はアシル基又はアルキル基を示し、特に炭素数が10から18の飽和若しくは不飽和のアシル基又はアルキル基が好ましく、例えば、アシル基としては、ラウロイル基、パルミトイル基、ステアロイル基又はオレオイル基等が、アルキル基としてはデシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、又はオクタデシル基等が挙げられる。

【0013】そして、一般式【1】で表されるPAF類緑体化合物の例としては、1-O-ヘキサデシル-2-スチルニル-s-n-グリセロール-3-ホスホコリン、1-O-ヘキサデシル-2-グルタリル-s-n-グリセロール-3-ホスホコリン、1-O-ヘキサデシル-2-アジポイル-s-n-グリセロール-3-ホスホコリン、1-O-ヘキサデシル-2-スベロイル-s-n-グリセロール-3-ホスホコリン、1-O-オクタデシル-2-スチルニル-s-n-グリセロール-3-ホスホコリン、1-O-オクタデシル-2-グルタリル-s-n-グリセロール-3-ホスホコリン、1-O-オクタデシル-2-アジポイル-s-n-グリセロール-3-ホスホコリン、1-O-オクタデシル-2-スベロイル-s-n-グリセロール-3-ホスホコリン又は1-O-ヘキサデカノイル-2-スチルニル-s-n-グリセロール-3-ホスホコリン等が挙げられる。

【0014】本発明における一般式【1】で表されるPAF類緑体化合物は、PAFアセチルヒドロラーゼにより加水分解され、一般式【1】の R_1 に相当するジカルボン酸とリゾPAF又はリゾPAF類緑体化合物を生成する。この生成したジカルボン酸の生成速度又は生成量を測ることにより、PAFアセチルヒドロラーゼ活性を測定することが出来る。

【0015】これは生成したジカルボン酸に特異的に反応する酵素を作用させ、場合によっては更に連続する酵素反応系を組み合わせて、 NAD^+ 、 $NADP^+$ 、 $NADH$ 、 $NADPH$ 又は過酸化水素等の繁用されているマーカー物質を生成させる。そして、これらのマーカー物質を公知の方法により測定することにより、ジカルボン酸の生成速度又は生成量を求め、これよりPAFアセチルヒドロラーゼ活性値を得ることができる。

【0016】ジカルボン酸に特異的に反応する酵素としては、スクシニル-C o Aシンターゼ【GDP生成】(EC 6. 2. 1. 4)、スクシニル-C o Aシンターゼ【ADP生成】(EC 6. 2. 1. 5)、コハク酸デヒドロゲナーゼ (EC 1. 3. 9. 9. 1)、コハク酸

セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (EC 1. 2. 1. 16)、又はグルタリル-C o Aシンターゼ (EC 6. 2. 1. 6) 等が挙げられる。

【0017】 NAD^+ 、 $NADP^+$ 、 $NADH$ 又は $NADPH$ の測定は、340 nmにおける吸光度の減少又は増加を測るか、電子伝達体とテトラゾリウム塩等の組み合わせによる発色を測定することにより行う。過酸化水素の測定は、パーオキシダーゼによりフェノール誘導体若しくはアニリン誘導体等と4-アミノアンチピリン等を縮合させて生成した色素を測定することにより行う。

【0018】本発明のPAFアセチルヒドロラーゼの活性測定方法における吸光度の測定は、エンド法でもレート法でも行うことができる。エンド法の場合には、まず本発明の一般式【1】で示される基質のみを除いた測定試薬と試料を反応させて、試料中に含まれる一般式

【1】の R_1 に相当するジカルボン酸や測定反応系に影響を与える物質を除去しておく必要がある。

【0019】レート法の場合には、定量的に測定が行える時間内に吸光度の測定を行えば良い。なお、PAFアセチルヒドロラーゼの活性値の算出は、 $NADH$ 、 $NADPH$ 又は生成する色素等の分子吸光係数より行か、一般式【1】の R_1 に相当するジカルボン酸等を標準物質として用いることにより行う。

【0020】また、本発明のPAFアセチルヒドロラーゼの活性測定方法は、用手法でも自動分析装置を用いても行うことができる。例えば、本発明の一般式【1】の R_1 がスクシニル基の基質を用いる場合には、PAFアセチルヒドロラーゼ活性を測りたい試料をこの基質に作用させ、生成してきたコハク酸を補酵素A (CoA) とグアノシン5'-三リン酸 (GTP) の存在下スクシニル-C o Aシンターゼ (GDP生成) に作用させる。

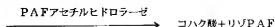
【0021】ここで生成したGDP (グアノシン5'-三リン酸) をホスホエノールビルビン酸とともにビルビン酸キナーゼに作用させる。そして、生じたビルビン酸を $NADH$ の存在下乳酸脱水素酵素 (LDH) に作用させると、 $NADH$ は NAD^+ に変化する。この時に、 $NADH$ の減少に伴って $NADH$ の吸収波長である340 nmにおける吸光度も定量的に減少するので、340 nmにおける吸光度の減少速度又は減少量より $NADH$ の減少速度又は減少量が算出される。

【0022】そして、この $NADH$ の減少速度又は減少量はPAFアセチルヒドロラーゼによるコハク酸の生成速度又は生成量と一対一の対応をなすので、これより試料中のPAFアセチルヒドロラーゼの活性値を算出することができる。以上の反応系を図式化すると下記のようになる。

【0023】

【化3】

1. 一般式〔1〕で表されるPAF類緑体化合物(R₁はスクシニル基)+H₂O



2. コハク酸+C o A+GTP



3. GDP+ホスホエノールビルビン酸 $\xrightarrow{\text{ビルビン酸キナーゼ}}$ ビルビン酸+GTP

4. ビルビン酸+NADH+H⁺



【0024】また、PAFアセチルヒドロラーゼ活性測定時には、キレート試薬を共存させることが好ましい。キレート試薬を共存させることにより、Ca²⁺依存性のホスホリバーゼA₂活性による本発明のPAF類緑体化合物の分解反応を抑制することができ、PAFアセチルヒドロラーゼ活性を特異的に測定することができるようになる。このキレート試薬としては、EDTAあるいはEGTA等公知のものを使用することができる。

【0025】本発明のPAFアセチルヒドロラーゼ活性測定方法は、組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼを阻害することなく、組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼ活性、血清型PAFアセチルヒドロラーゼ活性及び総PAFアセチルヒドロラーゼ活性を正確に測定することができる方法である。なお、本測定方法においては、測定時に組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼ阻害物質を作用させることにより、血清型PAFアセチルヒドロラーゼと組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼとを分別定量することが可能となる。なお、組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼ阻害物質としては、トリプシン等のプロテアーゼやフッ化ナトリウム、ジソプロピルフルオロリン酸又はジエチルピロカーボネート等が挙げられる。

【0026】PAFアセチルヒドロラーゼ活性を測定する試料としては、ヒト又は動物の血液、血清、血漿、尿若しくは羊水等の体液、そして、ヒト又は動物の細胞、臓器若しくは細胞及び臓器の抽出液等が対象となる。本発明におけるPAFアセチルヒドロラーゼの活性測定方法においては、一般式〔1〕で表されるPAF類緑体化合物の基質並びに生成されるジカルボン酸をマーカー物質に導きこれを測定するための酵素及び試薬は必須であるが、前記のキレート試薬又は組織細胞型PAFアセチルヒドロラーゼ阻害物質の他に、緩衝剤、安定剤、活性剤又は賦形剤等の酵素の活性測定に一般に用いられているものを使用しても良い。

【0027】そして、本発明におけるPAFアセチルヒドロラーゼの活性測定方法においては、活性測定時、一般式〔1〕で表されるPAF類緑体化合物の基質は、0.01~1.0mMの濃度範囲で使用するのが好ましい。他の成分は反応系の至適濃度で使用するのよいが、例え

ば、GTPは0.01~5mM、C o Aは0.01~5mM、スクシニル-C o Aシンターゼ等のジカルボン酸と反応する酵素は0.01~25U/l、ホスホエノールビルビン酸は1~50mM、ビルビン酸キナーゼは0.1~50U/l、NADHは0.01~10mM、LDHは0.1~100U/l及びキレート試薬は0.5~20mMの濃度範囲で使用するのが好ましい。また、緩衝剤はpH6.5からpH8.0の間に緩衝能を持つものならいずれも使用することができる。

【0028】なお、本発明の一般式〔1〕で表されるPAF類緑体化合物は、リゾPAFと無水ジカルボン酸を出発物質として、公知の合成方法により調製を行うことができる【A. Tokumura et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 155, 863-869(1988)】。例えば、50mgのリゾPAFと50mgの無水コハク酸を1mlのピリジン中、40℃で6時間加熱し、反応終了後、調製用薄層クロマトグラフィープレート(Analtech silica gel G plate)で精製することにより、本発明の一般式〔1〕のR₁がスクシニル基のPAF類緑体化合物を調製することができる。

【0029】

【実施例】以下実施例により本発明をより具体的に詳述するが、本発明はこの実施例によって何等限定されるものではない。

PAFアセチルヒドロラーゼ活性の測定

〔測定試薬〕

①基質試薬

2.0mM 1-O-ヘキサデシル-2-スクシニル-s n-グリセロール-3-ホスホコリン及び0.1% BSAを含む0.0M HEPES緩衝液(pH7.5)。

②酵素試薬

0.5mM GTP、0.5mM C o A、2.5mM 塩化マグネシウム、1.35mM 塩化カルウム、7.8mM ホスホエノールビルビン酸、2.0mM NADH、スクシニル-C o Aシンターゼ(GDP生成)0.15U/l、ビルビン酸キナーゼ1U/l及びLDH 4U/lを含む0.3M HEPES緩衝液(pH7.4)。

〔試料〕3種類の血清より調製した試料S1、S2及び

【操作】前記の酵素試薬 1、3.5 ml に試料 200 μ l を添加し、攪拌した後 37°C で 5 分間インキュベーション（加温）し、その後基質試薬 0.45 ml を添加して攪拌した後、37°C 恒温装置を備えた分光光度計を用いて、5 分間 1 分毎に 340 nm における吸光度を測定した。なお、試料のかわりに精製水を添加したものを対照とした。

【0030】この測定操作は、3 種類の試料それぞれについて 3 回ずつおこない、3 回の 1 分間当たりの吸光度変化量の平均を測定値とした。反応が定量的に進行していた 2 分目から 3 分目にかけての単位時間（1 分間）当りの吸光度の変化量（ $\Delta Abs.$ ）と NADH の分子吸光係数 $\epsilon = 6500$ から各試料の PAF アセチルヒドラーゼ活性値を算出した。

【0031】その結果は、 $S1 = 1.23$ (nmol/min/試料 50 μ l)、 $S2 = 1.03$ (nmol/min/試料 50 μ l)、 $S3 = 0.64$ (nmol/min/試料 50 μ l) であった。前記の試料の PAF アセチルヒドラーゼ活性を測定した時のタイムコースを図 1 に示した。

【0032】横軸は基質試薬を添加した後のインキュベーション時間、縦軸は基質試薬を添加した時の 340 nm における吸光度を 0 とした場合の吸光度の減少量を示す。なお、340 nm における吸光度の減少量、即ち NADH の減少量は、PAF アセチルヒドラーゼにより生成されるコハク酸の生成量、即ち PAF アセチルヒドラーゼ活性と一対一の対応をなしている。

【0033】この図より、インキュベーション初期には、試料中の PAF アセチルヒドラーゼにより生成されるコハク酸が反応時間に比例して定量的に増加していることが示されている。よって、本発明の PAF アセチルヒドラーゼ活性測定方法においては、測定反応が定

量的に進行することが確かめられた。

【0034】また、本発明の測定方法と従来のチオ PAF を基質として用いる PAF アセチルヒドラーゼ活性測定方法との相関を図 2 に示した。チオ PAF を基質として用いる測定方法（Y）と本測定方法（X）との相関は、回帰式： $Y = 1.462X + 0.237$ 、相関係数： $r = 0.9997$ と良い相関を示し、本測定方法は充分実用性があることが実証された。

【0035】なお、従来のチオ PAF を基質として用いる PAF アセチルヒドラーゼ活性測定方法の操作は、特開平 4-346797 号公報の記載に従って行った。

【0036】

【発明の効果】本発明による PAF アセチルヒドラーゼ活性測定方法は、試料中の PAF アセチルヒドラーゼ活性を放射性標識基質を用いることなく直接測定することが可能となるので、日常の検査に安全、迅速、簡便かつ高精度の測定方法として充分利用できる。

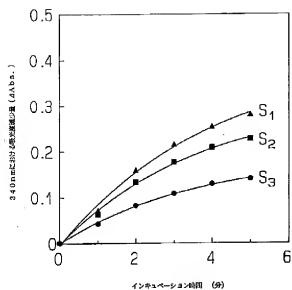
【0037】また、従来の方法より測定時間が短縮されたことにより疾患の検定、予後の経過を短時間で診断できるため有用性が高い。さらに、本発明の PAF アセチルヒドラーゼ活性測定方法は、組織細胞型 PAF アセチルヒドラーゼを阻害することなく、組織細胞型 PAF アセチルヒドラーゼ活性、血清型 PAF アセチルヒドラーゼ活性及び総 PAF アセチルヒドラーゼ活性を正確に測定することができる方法であり、各種炎症疾患の病態の診断にとって有用な方法である。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の測定方法により試料中の PAF アセチルヒドラーゼ活性を測定した時のタイムコースを示した図である。

【図 2】本発明の測定方法とチオ PAF を基質として用いる測定方法との相関を示した図である。

【図1】



【図2】

